Aus dem Institut für Ernährungslehre, Berlin.
Leiter: Prof. Dr. Sigwald Bommer

Vitamin C-Bestimmungen in Hagebuttenzubereitungen

unter besonderer Berücksichtigung des chemischen Ascorbinsäure-Nachweises

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des zahnärztlichen Doktorgrades an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

vorgelegt von

Ernst Dittmar

aus Berlin

Tag der Promotion: 23. Oktober 1940

Druck: Johannes Müller, Hamburg 8.

M 260

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. K r e u z
Referent: Prof. Dr. B o m m e r
Korreferent: Prof. Dr. F r i e b o e s

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhalt.

Seite

1. Vitamin C in der Nahrung und seine Bedeutung für den menschlichen Körper 5
2. Die Hagebutte als Vitamin C-Quelle 6
3. Die chemischen Bestimmungsmethoden für die Ascorbinsäure . . 7
4. Vergleichende Untersuchungen der gebräuchlichsten Bestimmungsmethoden 11
5. Ergebnisse der Vitamin C-Bestimmung in den verschiedenen Hagebuttenzubereitungen 19
6. Zusammenfassung 24

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548011_0100

1. Vitamin C in der Nahrung und seine Bedeutung für den menschlichen Körper.

Die Frage nach dem Vitamin C-Bedarf des menschlichen Körpers ist Gegenstand einer großen Reihe von Untersuchungen geworden. So kommt z. B. Rietschel (1) zu dem Ergebnis, daß nur 20 mg Vitamin C pro Tag nötig sind, um den optimalen Sättigungsgrad des Organismus zu gewährleisten, während Stutz und Reil (2) 50 mg pro Tag bei schwerer arbeitenden Menschen als nicht ausreichend fanden. Im Durchschnitt kann jedoch der Vitamin C-Verbrauch des Erwachsenen mit 50 mg pro Tag angegeben werden (3). Im Wachstumsalter, bei Infektionskrankheiten, sowie in der Zeit der Gravidität und Laktation ist der Vitamin C-Bedarf jedoch erheblich gesteigert.

Der Vitamin C-Bedarf wird in den Sommer- und Herbstmonaten durch die in reichlicher Menge zur Verfügung stehenden frischen Vegetabilien gedeckt. In den Winter- und Frühjahrsmonaten erreicht jedoch die Ernährung breitester Volksschichten infolge des Fehlens von frischem Obst und Gemüse nicht mehr den Durchschnittswert von 50 mg pro Tag. Als Vitamin C-Quelle kommt in dieser Zeit fast ausschließlich die Kartoffel in Betracht. In der meist üblichen Zubereitungsform als Salzkartoffel ist jedoch der tägliche Genuß von 400 bis 500 g — mehr wird im allgemeinen nicht verzehrt — unzureichend, um den Vitamin C-Bedarf zu decken (4).

Die unzureichende Vitamin C-Zufuhr bedingt eine allmähliche Verarmung des Organismus an C-Stoff und führt damit zu mehr oder weniger schweren präskorbutischen Krankheitsbildern. Zu den sehr zahlreich beschriebenen Symptomen dieser C-Hypovitaminosen gehören z. B. Zahnfleischveränderungen, die sich in Schwellung und erhöhter Blutungsneigung ausdrücken, ferner Blutungen in die Muskulatur und in das subkutane Gewebe. Einen breiten Raum nehmen die als Frühjahrsmüdigkeit bezeichneten Erscheinngen ein; hierbei handelt es sich vor allem um Mattigkeit, Appetitlosigkeit, mangelnde Arbeitsfreude, aber auch Herzbeschwerden, Atemnot und rheumatische Schmerzen gehören hierher. Besondere Beachtung verdient

ferner noch die wiederholt beobachtete Anfälligkeit gegenüber katarrhalischen Infektionen der Luftwege und des Magen-Darmkanals. Schließlich ist aus der großen Zahl weiterer Symptome noch die erhöhte Kariesfrequenz der Zähne zu erwähnen.

Das Bestehen einer C-Hypovitaminose setzt also den Gesundheitswert des Individuums erheblich herab. Um ein verbreitetes Auftreten dieser Mangelkrankheit zu verhindern, ist es deshalb anzustreben, das Vitamin C-Defizit der Winternahrung durch eine Vitamin C-reiche Beikost auszugleichen. Eine Möglichkeit hierzu ist in den verschiedenen Zubereitungsformen der Hagebutte gegeben.

2. Die Hagebutte als Vitamin C-Quelle.

Die Hagebutte ist die Scheinfrucht verschiedener Rosenarten (rosa canina, rosa rugosa Regeliana u. a.). Sie besteht aus einer eiförmigen, scharlachroten, fleischigen Hülle, die die harten Früchte (Kerne) umschließt. Während die Kerne kein Vitamin C aufweisen, ist das Fleisch der Hülle außerordentlich reich daran. Man findet durchschnittlich 750 mg%. (Kötschau (5)) hat in getrockneten Hagebuttenschalen sogar 1500 mg% nachgewiesen.)

Die Zubereitungsmöglichkeiten für frische Hagebutten sind sehr vielseitig. Abgesehen von der Verarbeitung zu Suppen und Fruchtspeisen, die für den sofortigen Verbrauch bestimmt sind, interessieren im vorliegenden Falle diejenigen Zubereitungsformen, die längere Zeit haltbar sind.

An erster Stelle steht hier die Herstellung von Hagebuttenmost und -süßmost, die bei entsprechender Zubereitung ihren hohen Vitamin C-Gehalt über einen langen Zeitraum bewahren können. Ein besonderer Vorteil dieser Zubereitungsform liegt darin, daß die Säfte meist ohne jeden Zusatz auch außerhalb der Mahlzeiten genossen werden können, während Hagebuttenmark oder -marmelade im allgemeinen mit Brot oder ähnlichem nur zu den entsprechenden Mahlzeiten (Frühstück, Vesper) verzehrt werden. Dennoch kommt auch der Zubereitung von Hagebuttenmark oder -marmelade, die ebenfalls gute Träger für das Vitamin C sind, eine bedeutende Rolle zu.

In Süddeutschland, wo die Verarbeitung der Hagebutte schon immer verbreitet war, findet sie neben diesen wichtigsten Zubereitungsformen auch noch Verwendung zur Herstellung von Hage-

buttenwein; weniger bekannt ist die Bereitung von Branntwein und Fruchtaromalikören aus Hagebutten (6), wobei diesen letzteren Zubereitungsformen eine Bedeutung als Vitamin C-Spender natürlich nicht zukommt.

Die Verarbeitung von Hagebutten zusammen mit anderem Obst ist besonders geeignet, den mitunter als unangenehm empfundenen, dumpfen Geschmack reiner Hagebuttenzubereitungen zu überdecken.

Schließlich sei noch an einen Vorschlag von Kötschau (5) erinnert, der empfiehlt, frische Hagebuttenschalen zu kandieren und so ihren hohen Vitamin C-Gehalt zu konservieren.

Getrocknete Hagebuttenschalen, besonders wenn sie in geschlossenen Behältern aufbewahrt werden, halten ihren Vitamingehalt recht lange. Sie sind deshalb zur Bereitung von Tees und Aufgüssen geeignet.

Die verschiedenen Zubereitungsprodukte aus Hagebutten wurden nun, soweit sie im Handel erhältlich waren, auf ihren Vitamin C-Gehalt geprüft. Leider konnte die Zahl der untersuchten Proben nicht so groß sein, wie es eigentlich vorgesehen war, da die Hagebuttenernte des Sommers 1939 größtenteils umgekommen ist, also auch entsprechend weniger Zubereitungsprodukte erhältlich waren. Es gelang jedoch, Proben aller üblichen Verarbeitungsformen zu beschaffen, so daß durch die Untersuchung festgestellt werden konnte, welche Zubereitungsform die höchsten und am längsten haltbaren Werte an Vitamin C aufzuweisen hatte.

3. Die chemischen Bestimmungsmethoden für die l-Ascorbinsäure.

Das Vitamin C ist chemisch als die l-Ascorbinsäure erkannt worden. Charakterisiert ist diese Verbindung durch ihr auffallend starkes Reduktionsvermögen und die stark saure Reaktion ihrer wäßrigen Lösungen. Das erste reversible Oxydationsprodukt ist die Dehydroascorbinsäure. Sie zeigt zwar kein Reduktionsvermögen und keine sauren Eigenschaften mehr, besitzt aber noch antiskorbutische Wirkung. Die weiteren Oxydationsprodukte sind dann auch ohne Vitamin C-Wirksamkeit (7, 8).

Zur Bestimmung des Gesamt-Vitamin C ist deshalb neben der l-Ascorbinsäure auch die Erfassung der Dehydroascorbinsäure notwendig.

Die Reduktion der Dehydroascorbinsäure wird erreicht durch längeres Einleiten von Schwefelwasserstoff in die Extraktionslösungen. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wird dann durch Evakuieren oder Durchleiten von Stickstoff quantitativ wieder entfernt.

Das gesamte Vitamin C liegt dann in Form von l-Ascorbinsäure vor und wird als solche bestimmt.

Für die Bestimmung der l-Ascorbinsäure stehen titrimetrische und kolorimetrische Methoden in großer Zahl zur Verfügung. Das Prinzip aller dieser Methoden ist jedoch das gleiche; es beruht auf den reduzierenden Eigenschaften der l-Ascorbinsäure.

So wird bei der am häufigsten angewendeten titrimetrischen Bestimmung nach Tillmans (9) der Farbstoff 2,6-Dichlorphenolindophenol durch die Ascorbinsäure in seine farblose Leukobase umgewandelt. Bei der Methode von Martini und Bonsignore (10) wird Methylenblau bei intensiver Belichtung zu Leukomethylenblau reduziert.

Der kolorimetrischen Methode von Bezssonoff (11) liegt die mit Molybdänphosphorwolframsäure-Reagens und Ascorbinsäure auftretende Violettfärbung zugrunde.

Die Verwendung von Folin-Reagens (12) zur Ascorbinsäurebestimmung ist zuerst von v. Euler (13), dann von Wachholder (14) u. a. beschrieben worden. Fujita und Ebihara (15) haben schließlich eine kolorimetrische Methode entwickelt, die auf der mit Folin-Reagens und Ascorbinsäure sich bildenden Blaufärbung beruht.

Neben diesen bekanntesten Methoden ist eine große Anzahl weiterer beschrieben worden, die aber im allgemeinen nicht zur Anwendung kommen.

Alle Methoden haben den Nachteil, daß sie für Ascorbinsäure nicht spezifisch sind, da jede andere reduzierende Substanz in mehr oder weniger starkem Maße dieselben Farbreaktionen hervorzurufen vermag, wodurch die Werte für die Ascorbinsäure zu hoch werden. Das Bestreben der verschiedenen Bestimmungsmethoden ist es nun, durch die Wahl des Extraktionsmittels sowie durch einen geeigneten p_H-Wert der Untersuchungslösungen die Wirkung anderer reduzierender Substanzen möglichst weitgehend auszuschließen.

Welches Maß an Zuverlässigkeit die verschiedenen Methoden besitzen, ist in einer Reihe von Arbeiten untersucht worden, in welchen die gebräuchlichsten titrimetrischen und kolorimetrischen Bestimmungen untereinander verglichen werden. So kommen Wachholder und Podestà (14) zu dem Ergebnis, daß die Methode mit dem Reagens von Bezssonoff, sowie die Bestimmung mit dem Tillmans-Indikator abzulehnen sind. Eine Entscheidung zwischen der Methylenblaumethode von Martini und Bonsignore und der kolorimetrischen Bestimmung mit dem Folin-Reagens konnten die Verfasser nicht treffen; es muß jeweils bestimmt werden, welche der beiden Methoden den niedrigeren Wert ergibt und damit die spezifischere ist.

Demgegenüber lassen Fujita und Ebihara (16) neben der von ihnen angegebenen Methode mit dem Folin-Reagens nur die Bestimmung mit dem Tillmans-Indikator gelten; die Methylenblaumethode, sowie die Methode von Bezssonoff erscheinen ihnen zu ungenau.

Von den verschiedenen Autoren wird also gemeinsam nur die Methode von Bezssonoff abgelehnt, während für die übrigen Bestimmungsverfahren die Meinungen auseinander gehen. Es erschien deshalb notwendig, die Indophenolmethode, die Methylenblaumethode und die Verwendung von Folin-Reagens für die Ascorbinsäurebestimmung nochmals miteinander zu vergleichen.

Der für die einzelnen Indikatoren eingeschlagene Arbeitsgang wird im folgenden kurz beschrieben.

A) Bestimmung der Ascorbinsäure mit 2,6-Dichlorphenolindophenol.

Die Methode mit dem Tillmans-Indikator wurde in der Modifikation von Dewjatnin und Doroschenko (17) angewendet. Danach wird die zu untersuchende Substanz mit 5%iger Essigsäure im Stickstoffstrom durch Kochen extrahiert. In einem Teil des Extraktes wird durch Einleiten von Schwefelwasserstoff die Dehydroascorbinsäure reduziert. Nach dem Vertreiben des überschüssigen Schwefelwasserstoffs wird die Lösung mit fein gepulvertem Calziumkarbonat und Bleiacetat von kolloidalen Substanzen und pflanzlichen Farbstoffen befreit. Das Filtrat wird zur Hälfte mit 80%iger Essigsäure verdünnt und mit 2,6-Dichlorphenolindophenol titriert.

Durch die starke Ansäuerung erhält der Extrakt einen für die Ascorbinsäure-Bestimmung äußerst günstigen p_H-Wert. In so stark saurem Milieu vermag zwar die Ascorbinsäure noch immer zu reduzieren, während die meisten andern im Gewebe vorkommenden reduzierenden Substanzen diese Fähigkeit verlieren.

Verluste an Ascorbinsäure während des Extrahierens durch Luftoxydation können durch möglichst schnelles Arbeiten vermieden werden.

Die Verwendung von 2,6-Dichlorphenolindophenol ist jedoch insofern mit Schwierigkeiten verbunden, als die Indikator-Lösungen infolge ihrer schnellen Verderblichkeit täglich frisch bereitet und eingestellt werden müssen.

B) Bestimmung der Ascorbinsäure nach der Methylenblaumethode.

Das Prinzip der Methode von Martini und Bonsignore beruht auf der Fähigkeit der Ascorbinsäure, in saurer Lösung Methylenblau bei genügend intensiver Beleuchtung zu entfärben. Dabei ist der Verlauf dieser Reaktion abhängig von dem p_H-Wert der Lösung und der Belichtungsintensität.

Zur Extraktion der Ascorbinsäure wird nach Wachholder und Podesta (14) 4,4%ige Sulfosalicylsäure verwendet. Der zentrifugierte und filtrierte Extrakt wird zur Reduktion der Dehydroascorbinsäure in der bereits erwähnten Weise mit Schwefelwasserstoff behandelt und nach Pufferung mt Natriumcitrat und Zusatz von Natriumthiosulfat mit einer Methylenblaulösung (1 : 10 000) titriert. Zur Belichtung wurde ein Projektionsapparat mittlerer Größe benutzt.

Die Verwendung von 4,4%iger Sulfosalicylsäure und die Pufferung mit Natriumcitrat schaffen für den Reaktionsablauf zwischen Ascorbinsäure und Methylenblau ein breites p_H-Optimum, so daß die von Neuweiler (18) geforderte p_H-Bestimmung des Extraktes zur Titerstellung der Methylenblau-Lösung unnötig wird.

Der Zusatz von Natriumthiosulfat zur Extraktionslösung hat endlich den Zweck, die Wiederauffärbung des reduzierten Methylenblaus zu verzögern, so daß der Endpunkt der Titration länger deutlich bleibt.

Der einmal bestimmte Titer der Methylenblau-Lösung bleibt lange konstant.

C) Bestimmung der Ascorbinsäure mit Phospho-18-wolframsäure.

Das Prinzip der von Fujita und Ebihara angegebenen Methode besteht darin, daß Folin-Reagens in genügend gepufferter saurer Lösung durch Ascorbinsäure reduziert wird, und die dabei entstehende blaue, höchst stabile Farbe kolorimetrisch bestimmt wird.

Die Extraktion der Ascorbinsäure geschieht im wesentlichen ebenso wie bei dem von Emmerie und v. Eekelen (19) angegebenen Verfahren. Danach wird die zu untersuchende Substanz nach Zusatz von Salzsäure und Merkuriacetat mit Quarzsand fein zermahlen. Der Extrakt wird mit Natriumacetat neutralisiert und gepuffert. Weiterer Zusatz von Bleiacetat dient zur Beseitigung von Verunreinigungen und pflanzlichen Farbstoffen.

Durch die Wirkung des Quecksilberacetats ist die vorhandene Ascorbinsäure in die reversibel oxydierte Form übergeführt worden, so daß das gesamte Vitamin C in Form von Dehydroascorbinsäure vorliegt. Zur Reduktion desselben wird der zentrifugierte und filtrierte Extrakt in der erwähnten Weise mit Schwefelwasserstoff behandelt.

Nach Trennung von den ausgefallenen Schwermetallsulfiden und Beseitigung des Schwefelwasserstoffs wird die Lösung mit Natriumphosphat nochmals gepuffert und mit Monojodessigsäure versetzt. Der Zusatz von Monojodessigsäure soll bewirken, daß andere das Folin-Reagens ebenfalls reduzierende Substanzen reaktionsunfähig gemacht werden.

Die Zugabe von Folin-Reagens endlich erfolgt in das auf 40° erwärmte Untersuchungsgemisch. Bei dieser Temperatur soll in kurzer Zeit der maximale Farbton der Lösung erhalten werden. Die kolorimetrische Messung wurde im Stufenphotometer von Pulfrich ausgeführt.

4. Vergleichende Untersuchungen der beschriebenen Bestimmungsmethoden.

Bevor die drei beschriebenen Bestimmungsverfahren an verschiedenen Hagebuttenpräparaten nebeneinander angewendet wurden, war es nötig, die einzelnen Indikatoren an Ascorbinsäure-Lösungen bekannter Konzentration einzustellen. Der Titer der dazu

verwendeten Ascorbinsäure-Lösungen wurde jodometrisch bestimmt.

Die Ermittlung des Titers der 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösungen bereitet dabei die geringsten Schwierigkeiten und ist besonders leicht ausführbar, wenn man den Farbstoff mit der Ascorbinsäure-Lösung titriert. Es wird also eine gemessene Menge Indikatorlösung vorgelegt und der Verbrauch an Ascorbinsäure-Lösung bekannter Konzentration bestimmt. Bei dieser Ausführung ist der Endpunkt der Titration auch bei gefärbten Extrakten durch das Verschwinden des Indikatorfarbtones leicht zu erkennen.

Für die Einstellung der Methylenblau-Lösung wurden Ascorbinsäure-Lösungen angewendet, die aus einer Stammlösung bekannten Gehalts durch Verdünnen mit 4,4%iger Sulfosalicylsäure erhalten wurden. Zur Belichtung wurde anfangs eine aus zwei nebeneinander montierten Kohlenstabpaaren bestehende Bogenlampe ohne Reflektor und Linsensystem benutzt. Es zeigt sich jedoch, daß mit dieser Art Lampe der gleiche Abstand zwischen den Kohlenelektroden sich nicht immer einstellen ließ, so daß die Lichtintensität ziemlich großen Aenderungen unterworfen war. Dieser Umstand machte sich in den ständigen Schwankungen des Titers der Methylenblau-Lösung bemerkbar, eine Tatsache, auf die Wachholder und Podesta (14) ebenfalls hingewiesen haben.

Für die weiteren Untersuchungen mußte also eine möglichst konstante Lichtquelle benutzt werden; hierzu diente ein Zeiss-Ikon-Projektionsapparat, der mit einer mittels Gebläse luftgekühlten 500 Watt Osram-Nitra-Glühbirne ausgestattet war.

Der Titer der Methylenblau-Lösung wurde nun bestimmt als Mittelwert aus einer größeren Anzahl von Titrationen verschieden konzentrierter Ascorbinsäure-Lösungen. Es wurde gefunden, daß 1 ccm Methylenblau-Lösung (1 : 10 000) 0,0504 mg Ascorbinsäure entspricht. Dieser Titer kommt dem theoretisch berechneten von 0,047 recht nahe.

Eine Veränderung des Titers in Abhängigkeit von dem p_H-Wert der Untersuchungslösung wird durch die Extraktion mit 4,4%iger Sulfosalicylsäure und durch die Pufferung mit Natriumcitrat vermieden. Der p_H-Wert der Extrakte nach Zusatz des Citratpuffers war stets gleich und wurde mit $p_H = 4{,}4$ gefunden. Zur Ermittlung

des p-Wertes wurden die Indikatoren zur Bestimmung der Wasserstoffionen-Konzentration nach Sörensen verwandt. Für gelegentliche Kontrollen wurde Universalindikator von Merck benutzt.

Es hatte sich gezeigt, daß das reduzierte Methylenblau nach etwa 3 bis 4 Minuten durch die Luftoxydation wieder aufgefärbt wird. Die Titrationen müssen also so schnell beendet sein, daß sie nicht mehr in die Zeit dieser unkontrollierbaren Methylenblau-Auffärbung fallen. Es empfiehlt sich daher die Konzentration der Untersuchungslösung so zu wählen, daß nicht mehr als 2 bis 3 ccm Methylenblau-Lösung verbraucht werden, weil sonst die für die Entfärbung notwendige Zeit zu groß wird.

Die Empfindlichkeit der Methylenblau-Methode ist recht groß. Bis herunter zu 0,2 mg Ascorbinsäure in 100 ccm Untersuchungslösung können einwandfrei gemessen werden und Unterschiede von 0,1 mg Ascorbinsäure in 100 ccm der einzelnen Untersuchungslösungen lassen sich unschwer erfassen.

Ein gewisser Nachteil der Methode liegt in dem verhältnismäßig engen Meßbereich, der eine ungefähre Kenntnis des Ascorbinsäure-Gehaltes der zu untersuchenden Substanz voraussetzt, um eine entsprechende Verdünnung wählen zu können.

Für die Untersuchung an Hagebuttenpräparaten empfiehlt es sich, den Extrakt aus 0,5 bis 1 g Einwage auf 25 ccm mit Sulfosalicylsäure zu verdünnen.

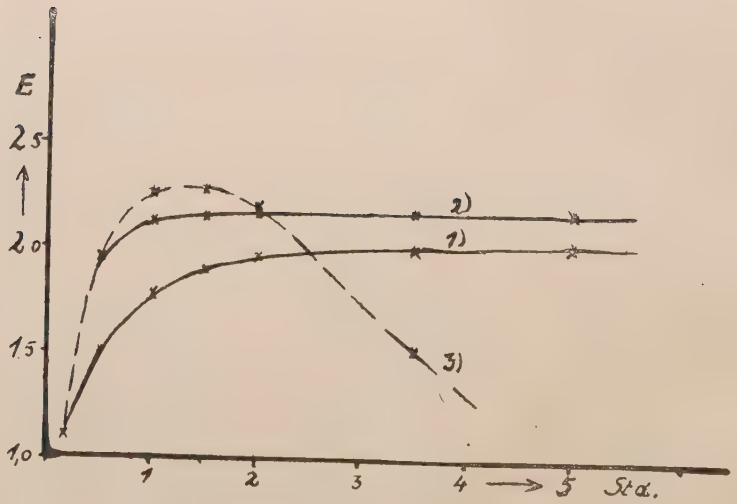
Für die Einstellung und Untersuchung des Folin-Reagenses wurden Ascorbinsäure-Lösungen in 2%iger Metaphosphorsäure benutzt, die nach der von Fujita und Ebihara (15) angegebenen Vorschrift verdünnt wurden. Die Ascorbinsäure-Konzentration wurde vor dem Ansetzen der Proben und nach dem Aufarbeiten der Proben vor Zusatz von Folin-Reagens jodometrisch bestimmt. Es zeigte sich dabei, daß stets ein kleiner Verlust an Ascorbinsäure bei der Aufarbeitung der Probe eintrat. Hierin liegt offenbar eine Fehlerquelle dieser Methode, denn es ist anzunehmen, daß die Verluste an Ascorbinsäure in verschiedenem biologischen Material nicht gleich groß sind.

Für die bis zu einem Gehalt von 12 mg% untersuchten Ascorbinsäure-Lösungen wurde die im Pulfrich-Photometer gemessene Extinktion der Konzentration proportional gefunden, d. h. das Verhältnis $\frac{\text{Ascorbinsäurekonzentration}}{\text{Extinktion}}$ ist eine Konstante, die als

k = 4,17 bestimmt wurde. Die Größe von k weicht damit erheblich von dem von Fujita und Ebihara angegebenen Wert für k = 8,7 ab. Dieser Unterschied erklärt sich aus der verschiedenen Konzentration des angewendeten Folin-Reagenses. Während das für die vorliegenden Untersuchungen benutzte Präparat eine fertig bezogene, wässerige Lösung von 10% Phospho-18-wolframsäure darstellte, haben Fujita und Ebihara mit einer Konzentration von 17,7% gearbeitet.

Die größere Verdünnung von Folin-Reagens kommt dabei der Empfindlichkeit der Methode zugute.

Es wurde festgestellt, daß die Intensität der Blaufärbung nach Zusatz von Folin-Reagens in die im Wasserbad auf 40° vorgewärmte Untersuchungslösung nicht sofort ihren Höchstwert erreichte, sondern — entgegen den Angaben von Fujita und Ebihara — sehr von der Dauer des weiteren Verbleibs der Lösung im Wasserbad abhing.



Figur 1.

Figur 1 zeigt den Verlauf der Intensität der Blaufärbung in Abhängigkeit von der Zeit, gemessen an den Extinktionen der Lösungen.

Die Untersuchungslösungen hatten dabei einen Gehalt von 3,92 mg% Ascorbinsäure. Während Probe 1 und 2 10 bzw. 30 Minuten nach Zugabe von Folin-Reagens im Wasserbad von 40° blieben und dann unter fließendem Wasser abgekühlt wurden, verblieb Probe 3 für die ganze Versuchsdauer im Wasserbad und wurde nur für die kurze Zeit der Messungen auf Zimmertemperatur gebracht.

Probe 1 und 2 wurden nach Abbrechen des Versuchs bei Zimmertemperatur aufbewahrt und die Extinktion nach 14 Stunden nochmals gemessen. Dabei zeigte sich, daß beide Proben den gleichen Extinktionswert aufwiesen, der mit dem am Vortage gemessenen Höchstwert der Probe 2 übereinstimmte.

Für die weiteren Untersuchungen wurden also die Proben nach Zusatz von Folin-Reagens 30 Minuten im Wasserbad von 40° gelassen und die Messung der Extinktion etwa 3 Stunden nach dem Abkühlen der Proben vorgenommen.

Die Empfindlichkeit der Methode ist unter diesen Bedingungen ebenso groß, wie die der Methylenblau-Methode. Der Meßbereich ist allerdings wesentlich größer.

Bei den kolorimetrischen Bestimmungen ist zu beachten, daß die Ablesung der Extinktion zwischen E = 0,10 und E = 1,3 liegt, weil außerhalb dieser Grenzen der photometrische Einstellfehler zu groß wird. Dieser Umstand ist von Bedeutung bei Untersuchungslösungen mit geringer Ascorbinsäure-Konzentration. Durch die Wahl einer größeren Schichtdicke der Untersuchungslösung gelingt es in den günstigen Meßbereich zu kommen, da die Extinktion der Schichtdicke proportional zunimmt.

Die so geeichten Indikatoren wurden nunmehr nebeneinander angewendet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1.

Untersuchungs-Material:	Indikator: Tillmans		Methylenblau		Folin-Reagens	
	mg Ascorbinsuäre					
1 ccm Dreifrucht-Saft	a) 0,504 (3) b) 0,488 (3) c) 0,491 (3)		0,331	(3)	0,484	(3)
1 g Hagebuttenmus	a) 0,516 (2) b) 0,513 (4) c) 0,507 (2)		0,383	(4)	0,506	(2)
1 ccm Hagebuttenmost mit Zucker	a) 1,109 (6) b) 1,130 (3) c) 1,147 (3)		0,574	(3)	1,082	(3)

a) im essigsauren Extrakt
b) im sulfosalicylsauren Extrakt
c) im Salzsäure-Quecksilberacetat-Extrakt
() = Zahl der jeweils angesetzten Proben.

Während für den Tillmans-Indikator und das Folin-Reagens die Werte annähernd gleich sind, liegen die mit der Methylenblaumethode gefundenen Ergebnisse wesentlich tiefer. Der Unterschied zwischen der Methylenblaumethode und den beiden anderen Bestimmungsverfahren ist so groß, daß es notwendig erschien, die mit der Methylenblaumethode gefundenen Werte durch weitere Untersuchungen zu stützen.

Mit dem Tillmans-Indikator wurde auch in den für die anderen Indikatoren spezifischen Extrakten die Bestimmung des Reduktionswertes vorgenommen. Wie Tabelle 1 zeigt, stimmen die dabei gewonnenen Werte innerhalb einer Fehlergrenze von ± 3% überein.

Dadurch ist zunächst erwiesen, daß die verschiedenen Extraktionsverfahren gleichwertig sind. Die Unterschiede bei der Ascorbinsäurebestimmung mit den verschiedenen Indikatoren sind also nicht durch Unvollkommenheiten einzelner Extraktionsverfahren bedingt, sondern müssen ihre Erklärung darin haben, daß andere, neben der Ascorbinsäure vorkommende reduzierende Stoffe von den verschiedenen Indikatoren in mehr oder weniger starkem Maße miterfaßt werden.

Der sehr hohe Gehalt an Gesamtzucker in den verschiedenen Hagebuttenzubereitungen — in der Marmelade über 50% — legt die Annahme nahe, hierin einen Grund für das unterschiedliche Verhalten der Indikatoren zu suchen.

Der Zucker liegt vorwiegend in Form reduzierender Arten vor, also als natürlich vorkommende, wie auch bei der Inversion des Rohrzuckers entstehende d (+) -Glucose und d (—) -Fructose. (Die Schreibweise gibt sowohl die chemische Konfiguration, wie die effektive Drehung des polarisierten Lichtes an.) Der Einfluß dieser Zuckerarten auf die Ascorbinsäure-Bestimmung wurde nun im einzelnen unteresucht.

Dabei wurde zu den für eine 4%ige Lösung eingewogenen Zuckermengen 1 ccm einer Ascorbinsäure-Stammlösung zugesetzt und mit den für die einzelnen Indikatoren spezifischen Extraktionsmitteln auf 25 ccm verdünnt. Der Gehalt der Ascorbinsäure-Stammlösung wurde jodometrisch kontrolliert.

Das Ergebnis der Bestimmung des Reduktionswertes dieser Lösungen ist in Tabelel 2 wiedergegeben.

Tabelle 2.

Ansatz	Indikator: Tillmans	Methylenblau	Folin-Reagens
Ascorbinsäure-Lösung ohne Zuckerzusatz	5,8 ccm	1,725 ccm	E = 0,115
mit 4% Rohrzucker	5,8	1,73	0,11
mit 4% Glucose	6,5	1,73	0,11
mit 4% Fructose	6,4	1,73	0,43
mit 6% Zuckergemisch (zu gl. Teilen)	6,5	1,72	0,25

Auf die Bestimmung der Ascorbinsäure mit Methylenblau haben die Zucker demnach keinen Einfluß. Der Tilmans-Indikator dagegen spricht auf die beiden reduzierenden Zuckerarten merklich an. Auf das Folin-Reagens endlich ist die d-Glucose ohne Einfluß, während mit der d-Fructose deutliche Reaktion eintritt.

Als Grund für das verschiedene Verhalten der beiden Monosen gegenüber dem Folin-Reagens kann der Unterschied in ihrer chemischen Struktur angeführt werden. Danach läßt sich vermuten,

daß Phospho-18-Wolframsäure von der d-Fructose als einer Ketose reduziert wird, während mit einer Aldose, wie der d-Glucose eine solche Reaktion nicht eintritt.

Der Einfluß anderer reduzierender Stoffe neben der Ascorbinsäure auf den Tillmans-Indikator und das Folin-Reagens ist somit erwiesen. Daß es sich außer den reduzierenden Zuckern dabei auch um andere, chemisch nicht so leicht erfaßbare Substanzen handelt, die vielleicht auch auf die Methylenblau-Methode von Einfluß sind, ist damit nicht ausgeschlossen.

Jedenfalls wird die Ueberlegenheit des Methylenblaus gegenüber den beiden anderen Indikatoren durch diese Versuchsreihe deutlich.

Endlich war zu beweisen, daß der für reine Ascorbinsäure-Lösungen bestimmte Titer der Methylenblau-Lösung auch für die pflanzlichen Extrakte seine Richtigkeit behielt.

Dazu wurde der Extrakt von Dreifrucht-Saft mit einer jodometrisch bestimmten Ascorbinsäure-Stammlösung in 4,4%iger Sulfosalicylsäure in verschiedenem Verhältnis gemischt und der Verbrauch an Methylenblau-Lösung bestimmt.

Unter der Annahme, daß der für reine Ascorbinsäure-Lösungen gewonnene Titer von 0,0504 auch für die pflanzlichen Extrakte gilt, wurde die in den verschiedenen Ansätzen vorhandene Ascorbinsäure-Menge und daraus wiederum der Verbrauch an Methylenblau-Lösung unter Verwendung des angegebenen Titers errechnet.

Tatsächlich wird für jedes Mischungsverhältnis zwischen Extrakt und Stammlösung der Verbrauch an Methylenblau-Lösung dem berechieten Wert gleich groß gefunden, wie aus Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3.

Ansatz	mg-Ascorbinsäure	zusammen	ccm Methylenblaulösung berechnet	gefunden
5 ccm Extrakt		0,0660		1,31
4 ccm Extrakt	0,0528			
1 ccm Stammlösung	0,0194	0,0722	1,43	1,44
3 ccm Extrakt	0,0396			
2 ccm Stammlösung	0,0388	0,0784	1,56	1,56
2 ccm Extrakt	0,0264			
3 ccm Stammlösung	0,0582	0,0846	1,68	1,67
5 ccm Stammlösung		0,0970	1,92	1,92

Damit ist die allgemeine Gültigkeit des Titers der Methylenblau-Lösung erwiesen.

Für die Untersuchungen an Hagebuttenzubereitungen kommt demnach gegenüber den beiden anderen Verfahren der Methylenblau-Methode die größere Spezifität für die Ascorbinsäure-Bestimmung zu.

5. *Ergebnisse der Vitamin C-Bestimmung in den verschiedenen Hagebuttenzubereitungen.*

Bei der Anwendung der Methylenblau-Methode werden Werte erhalten, die z. T. ganz erheblich unter den bisher mit dem Tillmans-Indikator angegebenen liegen; besonders deutlich wird dieser Unterschied bei künstlich gezuckerten Zubereitungsformen, da durch die Inversion des Rohrzuckers die Menge an reduzierdenen Zuckerarten steigt.

Ganz allgemein ist der Vitamin-C-Gehalt der untersuchten Hagebuttenzubereitungen nicht sehr hoch, da die Bestimmung zu einem Zeitpunkt erfolgte (Ende Februar und Anfang März 1940), an dem infolge des Lagerns schon ein mehr oder weniger großer Verlust an Vitamin C eingetreten ist.

Die absolute Größe des Vitamin C-Gehaltes erscheint für die folgenden Betrachtungen auch nicht von so ausschlaggebender Bedeutung. Was jedoch für die Beurteilung der einzelnen Herstellungsverfahren umso wichtiger ist, das ist das Verhältnis der verschiedenen Ergebnisse untereinander. Auch hierzu müssen die Werte der Methylenblau-Methode herangezogen werden, denn mit den andern Bestimmungsverfahren wird das Bild zu ungenau. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, zeigt die Methylenblau-Methode z. B. da einen Anstieg, wo mit den andern Methoden der Unterschied kaum deutlich wird, während bei stark zugenommenen Werten der andern Nachweisverfahren das Ergebnis der Methylenblau-Methode nur wenig angestiegen ist. Die Methylenblau-Methode ergibt also in jeder Hinsicht die spezifischeren Ergebnisse.

Die in folgenden gemachten Angaben beziehen sich auf den Gehalt an Gesamt-Vitamin C. Die Menge an reversibel oxydierter Form wurde nicht bestimmt; die Proben wurden durchweg mit Schwefelwasserstoff behandelt, so daß die Vitamin C-wirksamen Substanzen insgesamt als l-Ascorbinsäure bestimmt wurden.

Die Entnahme der Proben erfolgte sofort nach dem Eröffnen der Behältnisse mit Hornlöffeln oder Glaspipetten; jede Metallberührung wurde vermieden. Bei der Aufarbeitung der Proben wurde möglichst schnell gearbeitet, um eine Luftoxydation weitgehend zu vermeiden.

Als Unterlage für die Angaben über die Zubereitung der einzelnen Proben liegen z. T. die Rezepte der Herstellungsfirmen vor, aus denen das Prinzipielle mitgeteilt wird.

Ganz allgemein ist bei der Herstellung von Hagebuttenzubereitungen zu beachten, daß keine Metallgefäße, vor allem keine Kupferkessel benutzt werden. Dem Kupfer kommt offenbar eine katalytische Wirkung zu, durch die die Zerstörung des Vitamins außerordentlich beschleunigt wird. Eine vorübergehende, kurze Metallberührung beim Zerkleinern und Pressen der Hagebutten ist nicht zu vermeiden und hat keinen wesentlichen Einfluß auf den Vitamin C-Gehalt.

Nach K ö t s c h a u ist es notwendig, um eine Zerstörung des Vitamins beim Lagern zu verhindern, daß die in den Hagebutten vorkommenden Oxydasen und Katalasen unwirksam gemacht werden. Es geschieht dies durch mindestens 10 Minuten langes Kochen oder Dämpfen der Früchte; eine zerstörende Wirkung auf das Vitamin C durch diesen Prozeß ist nicht zu befürchten. Ein zu langes Kochen oder Abbrühen der Hagebutten schadet dabei weniger, als ein zu kurzes Erhitzen.

N a t v i g (20) hat die Extrakte, die er durch verschieden langes Kochen nicht vorbehandelter Hagebuttenschalen erhielt, kurze Zeit nach ihrer Herstellung auf ihren Vitamin C-Gehalt untersucht. (Allerdings unter Benutzung des T i l l m a n s - Indikators.) Er fand dabei, daß erst nach einer Kochzeit von 15 Minuten die Extrakte den Höchstwert an Vitamin C aufweisen. Diese lange Extraktionszeit dient nicht so sehr dem vollständigen Aufschließen des pflanzlichen Zellmaterials, (eine nahezu vollständige Extraktion der wasserlöslichen Substanzen ist schon nach viel kürzerer Zeit erfolgt) als vielmehr dem Inaktivieren der die Oxydation des Vitamins beschleunigenden Fermente. Ein deutliches Abfallen von dem Höchstwert zeigen erst die Extrakte, die länger als 25 Minuten gekocht wurden. Der nunmehr einsetzende Vitamin C-Verlust ist auf die durch die Siedehitze stark beschleunigte Luftoxydation zurückzuführen. Die Versuchsreihe zeigt also, daß die restlose Zerstörung der Oxydasen

erst nach 15 Minuten langem Kochen oder Dämpfen eingetreten ist; längeres Erhitzen — bis zu 25 Minuten — bleibt ohne wesentliche Wirkung auf das Vitamin C.

Der Zusatz von Wasser und Zucker zu den meist halbierten, von Kernen und Haaren gereinigten Hagebuttenschalen, sowie die weitere Verarbeitung bis zum Einmachen der fertigen Zubereitung ist nach den einzelnen Herstellungsverfahren sehr verschieden.

Von Bedeutung ist schließlich noch der Zeitpunkt des Erntens der Hagebutten, denn nur vollreife, hochrote Früchte weisen den optimalen Vitamin C-Gehalt auf. Zu frühreife Früchte haben diesen Höchstwert noch nicht erreicht, während bei zu spät, also nach den ersten Frösten in schon weichem Zustand eingesammelten Hagebutten im Zusammenhang mit der natürlichen Mazeration der Vitamin C-Gehalt schon wieder abgesunken ist. Der günstigste Zeitpunkt für das Ernten der Hagebutten liegt je nach den Witterungsverhältnissen des Jahres im September bis Oktober.

Die Vitamin C-Bestimmung in den verschiedenen Hagebuttenzubereitungen hatte nun folgendes Ergebnis:

Tabelle 4.

Probe Nr.	Bezeichnung	Vitamin C-Gehalt
1)	Hagebuttenmus	38,3 mg%
2)	Hagebuttenmus	42,0 mg%
3)	Zweifruchtmarmelade	13,0 mg%
4)	Hagebuttenmost	39,0 mg%
5)	Hagebuttenmost	65,4 mg%
6)	Dreifruchtsaft	33,2 mg%
7)	Fünffruchtsaft	58,1 mg%

Der Vitamin C-Gehalt ist bei allen Proben nicht sehr hoch. Immerhin liegen die Werte nach einer etwa 4monatigen Lagerzeit noch so, daß von den als gut zu bezeichnenden Zubereitungen der tägliche Genuß von 80—120 g genügt, um den menschlichen Vitamin C-Bedarf zu decken. Es ist zu erwarten, daß bei weiterem Lagern der Vitamin C-Gehalt der Proben allmählich noch mehr absinkt. Dem gegenüber wird in entsprechend steigendem Maße aber mit dem Fortschreiten der Jahreszeit der Vitamin C-Bedarf aus den nun wieder anfallenden frischen Vegetabilien gedeckt werden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist auffallend, daß die Säfte und Moste trotz des größeren Verhältnisses von Hagebutten zu Wasser einen durchschnittlich höheren Vitamin C-Gehalt aufweisen, als die festen Zubereitungsformen. Eine Erklärung hierfür ist nicht zu finden, es sei denn der Hinweis, daß die Herstellung der untersuchten Moste von Firmen ausgeführt wird, die ihre Herstellungsverfahren besonders hoch entwickelt haben.

Im folgenden werden nun die Herstellungsverfahren soweit sie bekannt waren, beschrieben.

Das Hagebuttenmus, Probe 1, wird, um den Zutritt der Luft möglichst zu vermeiden, in geschlossenen Behältern zubereitet. Die Hagebutten werden in einem geschlossenen Autoklaven kurz gedämpft und durch eine geschlossene Passiermaschine gebracht. Nach Zusatz von Zucker und bestimmten Geschmackskorrigenzien ist das Mus tafelfertig.

Für das Hagebuttenmus, Probe 2, fehlen die Angaben über die Herstellung.

Bei der Zubereitung der Zweifruchtmarmelade, Probe 3, wird zunächst das Apfelmark mit Zucker aufgekocht und erst nachdem der Zucker vollständig gelöst ist, wird das Hagebuttenmark zugesetzt. Nach kurzem Aufwallen wird die Marmelade eingemacht. Angaben über das Gewichtsverhältnis von Aepfeln zu Hagebutten liegen nicht vor. Aus dem Geschmack der Marmelade, in dem der charakteristische Geschmack reiner Hagebuttenzubereitung ganz fehlt, geht hervor, daß die Hagebutten nur als kleinerer Teil dieser Fruchtmischung vorliegen.

Bei der Herstellung des Hagebuttenmostes, Probe 4, wird — abgesehen von dem einmaligen kurzen Brühen der frischen Hagebuttenschalen — kalt gearbeitet und erst nach der Fertigstellung des Mostes wird zur Haltbarmachung pasteurisiert. Nach den Erfahrungen der Herstellungsfirma darf das Verhältnis Hagebuttenschalen zu Wasser eine bestimmte Verdünnung nicht überschreiten, da sonst beim Lagern des Mostes Vitamin C schneller verloren geht.

Bemerkenswert ist die Zubereitungsart des Hagebuttenmostes, Probe 5. Der ganze Herstellungsprozeß wird hierbei in einer Atmosphäre indifferenten Gases vorgenommen. Die zerkleinerten Hagebuttenschalen werden mit Wasser gemischt und abgepreßt. Der abfließende Most wird sofort auf Flaschen gefüllt und — ebenfalls noch in indifferenter Gasatmosphäre — pasteurisiert. Die Herstel-

lungsfirma weist besonders auf die Schnelligkeit hin, mit der bei der Herstellung des Mostes gearbeitet wird; der Saft ist spätestens zwei Stunden nach dem Zerkleinern der Hagebuttenschalen haltbar auf Flaschen. Die schonende Herstellungsart dieses Hagebuttenmostes drückt sich auch in dem Ergebnis der Vitamin C-Bestimmung aus und darf als die beste Zubereitungsform gelten.

Angaben über die Zubereitung des Dreifrucht- und Fünffruchtsaftes können aus besonderen Gründen nicht gemacht werden.

Endlich wurden noch getrocknete Hagebuttenschalen der Ernte 1939 untersucht. Ihr Vitamin C-Gehalt wurde mit 257 mg% bestimmt. Bei 15 Minuten langem Kochen der Schalen und dem sofort anschließenden Genuß des so bereiteten Tees ist es möglich, den in den Schalen zur Verfügung stehenden Vitamingehalt fast ohne Verlust auszunützen. Der Genuß solcher Tees vermag daher in günstigster Weise die Vitamin C-Versorgung in den Wintermonaten zu unterstützen.

6. Zusammenfassung.

Es wird darauf hingewiesen, daß die Winterernährung meist ein erhebliches Vitamin C-Defizit aufweist, daß zu Vermeidung ausgedehnter Schäden gedeckt werden muß. Hierzu ist die Hagebutte in ihren verschiedenen Zubereitungsformen geeignet.

Die für die chemische Vitamin C-Bestimmung gebräuchlichsten Methoden werden miteinander verglichen. Dabei wird festgestellt, daß die Methylenblau-Methode von Martini und Bonsignore die spezifischeren Werte liefert. Zugesetzte Mengen reiner Ascorbinsäure werden nach dieser Methode im biologischen Extrakt quantitativ wiedergefunden.

In Nebenversuchen wird der Einfluß der in den Hagebuttenzubereitungen in reichlicher Menge vorhandenen Zuckerarten untersucht. Dabei wird gefunden, daß der Tillmans-Indikator und das Folin-Reagens mit einzelnen Zuckern reagieren, von denen das Methylenblau nicht reduziert wird.

Daraus erklärt es sich, daß die mit Methylenblau-Methode gefundenen Werte z. T. ganz erheblich unter den bisher genannten liegen.

Es wird die Vitamin C-reichste Zubereitungsform der Hagebutten ermittelt, deren Herstellungsverfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß der gesamte Arbeitsgang in einer Atmosphäre indifferenten Gases und mit besonderer Schnelligkeit ausgeführt wird.

Literaturnachweis.

1. Rietschel, Klin. Wschr. 1939, 923.
2. Stutz und Reil, Veröffentl. aus d. Gebiete d. Marine-Sanitätswesens **30,** (1938), 149.
3. Stepp, Kühnau und Schröder, Die Vitamine und ihre klinische Anwendung. Stuttgart: Enke 1939.
4. Wachholder, Biochem. Zeitschr. **295,** (1938), 237.
5. Kötschau, Leib und Leben **7,** (1939), 21.
6. Bömer, Juckenack und Tillmans, Handbuch der Lebensmittelchemie, Berlin: Julius Springer 1938.
7. Ammon und Dirscherl, Fermente, Hormone, Vitamine. Leipzig: Georg Thieme 1938.
8. Karrer, Lehrbuch der organischen Chemie. Leipzig: Georg Thieme 1936.
9. Tillmans und Mitarbeiter, Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm. **60,** (1930), 34. ebenda **63,** (1932), 1, 21, 241, 267, 276.
10. Martini und Bonsignore, Biochem. Zeitschr. **273,** (1934), 170.
11. Bezssonoff, Zeitschr. f. Vitaminforschung **5,** (1936), 193.
12. Folin, Journ. of Biol. Chem. **86,** (1930), 179.
13. von Euler und Burström, Biochem. Zeitschr. **283,** (1935), 153.
14. Wachholder und Podesta, Zeitschr. f. physiol. Chemie. **239,**
15. Fujita und Ebihara, Biochem. Zeitschr. **290,** (1936), 182.
16. —, ebenda **290,** (1936), 172.
17. Dewjatnin und Doroschenko, ebenda **280,** (1935), 118.
18. Neuweiler, Klin. Wschr. 1936, 856.
19. Emmerie und v. Eekelen, Biochem. Journ. **28,** (1934), 1153.
20. H. Natvig, Zeitschr. f. „Die norwegische Aerztevereinigung" (norwegisch) 1939, 16.

Lebenslauf.

Am 13. April 1913 wurde ich, Andreas Peter Ernst Dittmar als Sohn des Rendanten Hermann Dittmar und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Strohkorb, in Berlin geboren. Nach einem neunjährigen Besuch des Friedrichs-Realgymnasiums in Berlin bestand ich im März 1931 meine Reifeprüfung. Von 1934 bis 1935 diente ich ein Jahr freiwillig bei der Reichswehr. Im Wintersemester 1935/36 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin. Am 1. April 1938 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung mit „sehr gut“ und erhielt am 21. Dezember 1939 meine Approbation als Zahnarzt mit dem Urteil „sehr gut“.